

ニターが必要であると考えられる。そこで、多種のげっ歯類の抗体を検出することができる Protein A を用いて、昨年度までに安定した Protein A-標識試薬を選定・作成してきた。今年度はこの Protein A-金コロイドコンジュゲートを用いた ICG のヤチネズミ類への適応について評価した。多くの検体を使用して従来の抗体検出法である ELISA および IFA による結果と比較した結果、有用性が確認された。ヒトの HFRS の原因となり、また患者数の比較的多い PUUV について簡便に宿主げっ歯類の抗体を検査できるシステムが構築されたことから、安全かつ簡便にこれらの病原体の侵入について監視を行うことが可能となった。これまでにラット類を対象とする ICG の作成と評価を行ってきた。今回は PUUV 関連ウイルスとその宿主についてのシステムが構築された。この二種のウイルスとその宿主に対応することで、頻度の高い HFRS の原因となるハンタウイルス感染症についてのモニターが可能となった。しかしながら南米および北米由来の HPS の原因となるハンタウイルス感染症の宿主げっ歯類を対象とした ICG についても、今後評価を行っていくことが必要である。最終的には全てのげっ歯類に適応できる Multiplex ICG を完成が期待される。今年度はそのために必要なひとつの課題を達成したと考えられる。

#### E. 結論

ハンタウイルスの病原性については未だほとんど明らかになっていない。ハンタウイルス感染症を制御するためには、疫学的な解析をより効率よく行い、さらに病原性解析のためのツールをより

多く持つことが必要となる。本研究では Multiplex ICG を用いてウイルス宿主のスクリーニング効率を大幅に上昇させ、さらにマウスモデルを用いた病原性の解析を進めることで、近隣諸国から侵入するおそれのあるハンタウイルス感染症対策を進める事が出来ると考えられる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

小山芽以、吉松組子、好井健太郎、有川二郎、苅和宏明、イムノクロマトグラフィー法によるハンタウイルスの迅速診断法の開発、第158回日本獣医学会学術集会、9月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)  
分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究  
人獣共通感染症の病理学的検索 -フラビウウイルスの病理学的鑑別-

国立感染症研究所感染病理部  
永田典代

研究要旨: マウスモデルを利用し、3つの神経向性フラビウウイルスの病理について解析した結果、いずれもマウスの錐体神経細胞に感染し、非特異的脳炎像を示した。一方でマウスモデルにおける病像がウイルスによって異なるのは神経系への侵入経路が一因であることを病理学的に示した。病理組織像によるウイルスの鑑別診断は困難であり、各フラビウウイルスに対する抗体が有用であった

#### A 研究目的

わが国のフラビウウイルス感染症には日本脳炎と、ロシア春夏脳炎として知られるダニ媒介性脳炎がある。さらに、ウエストナイル熱・脳炎は輸入感染症例や流行が危惧されている。いずれもフラビウウイルス科フラビウウイルス属が原因となり、新興・再興感染症として警戒されている。これらのフラビウウイルスはいずれも感染後にウイルス血症を引き起こし、中枢神経系に侵入後、神経細胞に感染し、直接的あるいは炎症反応によって細胞を破壊する。そのため、致死性あるいは後遺症を残すことがある。よって、予防が重要な感染症である。われわれは、フラビウウイルス感染症による脳炎発症機序の解明と新規ワクチン評価系の確立を目的として、BALB/c を用いてウイルス血症モデルを確立し、病理学的解析を行ってきた。今年度は、脳炎関連フラビウウイルスの神経病原性の相違点を明らかにする目的で、ダニ媒介性脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、および日本脳炎ウイルスの感染病理を総合的に比較し検討した。

#### B.研究方法

本研究班でこれまでに実施したフラビウウイルス感染マウスの感染組織ホルマリン固定標本を用いて病理学的検索を行った。感染実験の概略は次の通りである。なお、ウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスの感染実験は国立感染症研究

所村山分室高度安全実験施設、ダニ媒介脳炎ウイルスは長崎大学熱帯医学研究所において各機関のバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV, Sofjin 株)、日本脳炎ウイルス(JEV, JaTH 株)、あるいはウエストナイルウイルス(WNV, NY99 株)を用い、一匹あたり100%致死ウイルス量に相当するウイルス量を 8 週齢の BALB/c マウスにそれぞれ静脈内接種した。接種 3、5、あるいは 7 日目(一群 3 匹)と瀕死期にこれらの動物(一群 3、9 あるいは 14 匹)を過麻酔殺、心臓採血し心臓からの 10%ホルマリン緩衝液の灌流固定を行った。その後、臓器を採取し、これら採取した組織材料は 10% ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。常法通り、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。さらに、ウイルス抗原の検出のため、抗 TBEV-E ウサギポリクローナル抗体、抗 JEV-E ウサギポリクローナル抗体、あるいは抗 WNV-E マウスモノクローナル抗体を用いたポリマー法(Vector 社あるいはニチレイ)による免疫組織化学染色を行った。なお、抗原賦活化方法には 0.05%塩化カルシウム添加 0.025%トリプシン(37°C30 分)あるいは pH 6.0 あるいは pH9.0 の抗原賦活化液(121°C10 分)を用いた。

【倫理面への配慮】

(倫理面への配慮)本動物実験は、国立感染症研究所あるいは長崎大学熱帯医学研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従い行った。

### C.研究結果

それぞれの接種群の瀕死期中枢神経系組織病変とウイルス抗原所見を図に示した。また、経時的な病変とウイルス抗原陽性の動物数の変化を表にまとめた。TBEV 接種群では 7 日目には立毛、腹部膨満、元気消失を呈し、8 日目には瀕死となった。これらの個体では、腸管筋層の神経叢および大脳・脳幹・脊髄および小脳の神経細胞にウイルス抗原が検出された。脊髄に髄膜炎が認められたが、脳幹と大脳皮質のウイルス検出部位における炎症性反応は乏しかった。JEV 接種群では脳炎による神経症状を発症し、およそ 11 日目に髄膜炎、脳炎所見を伴い瀕死となった。大脳皮質に強い急性壊死が認められた。WNV 接種群では腹部膨満、弛緩性麻痺あるいは脳炎症状と個体によって異なる症状を示し、およそ 9 日目に瀕死となった。炎症性反応は比較的弱かった。いずれも大脳・脳幹・脊髄の大型の錐体神経細胞にウイルス抗原陽性細胞が認められた。

### D.考察

いずれのウイルスも、静脈内接種後に中枢神経系に侵入し、大型の錐体神経細胞に感染、増殖し、神経症状を引き起こし、非特異的な所見を示した。いくつかの相違点が明らかとなったが、これらは神経系への侵入経路が一因であると考えられた。TBEV の Sofjin 株は、血中からまず腸管の神経叢にウイルスが伝播し、増殖し、神経細胞が破壊されるため、腸管の拡張が引き起こされたと考えられた。病理学的に Sofjin 株はマウスの神経細胞に非常に強い親和性を示し、血中のウイルスは神経叢から自律神経系を介して中枢神経系に移行すると考えられた。JEV の JaTH 株感染は、臨床症状発現前の期間、リンパ節でウイルスが分離された(データは示さない)。よって、リンパを含む血流

を介して中枢神経系へ移行し、大脳皮質が主な標的組織であったと考えられた。WNV の NY99 株感染は個体によって異なる病態を示しており、中枢神経系への経路として、血行性と神経行性の両方の経路が考えられた。そのため、個体によって種々の臨床症状を示したと考えられた。これらの病原性は、分離後の継代歴やウイルスそのものの特徴が反映されていると考えられる。ヒトにおいて WNV や TBEV の腸管神経叢への感染は不明であるが、TBEV 感染患者には悪心、嘔吐、胃痛、食欲不振など胃腸症状を発症初期から訴えるものも報告されている。

### E.結論

3 つの神経向性フラビウイルスはマウスにおいて異なる病原性を示すが、これらはウイルス血症後の中枢神経系侵入経路の違いが反映されており、組織病変によるウイルス種の鑑別は困難であった。

### F.研究発表

#### 1. 論文発表

1) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 74(3):250-260,2015.

#### 2. 学会発表

該当無し

### G.知的財産権の出願・登録状況

該当無し

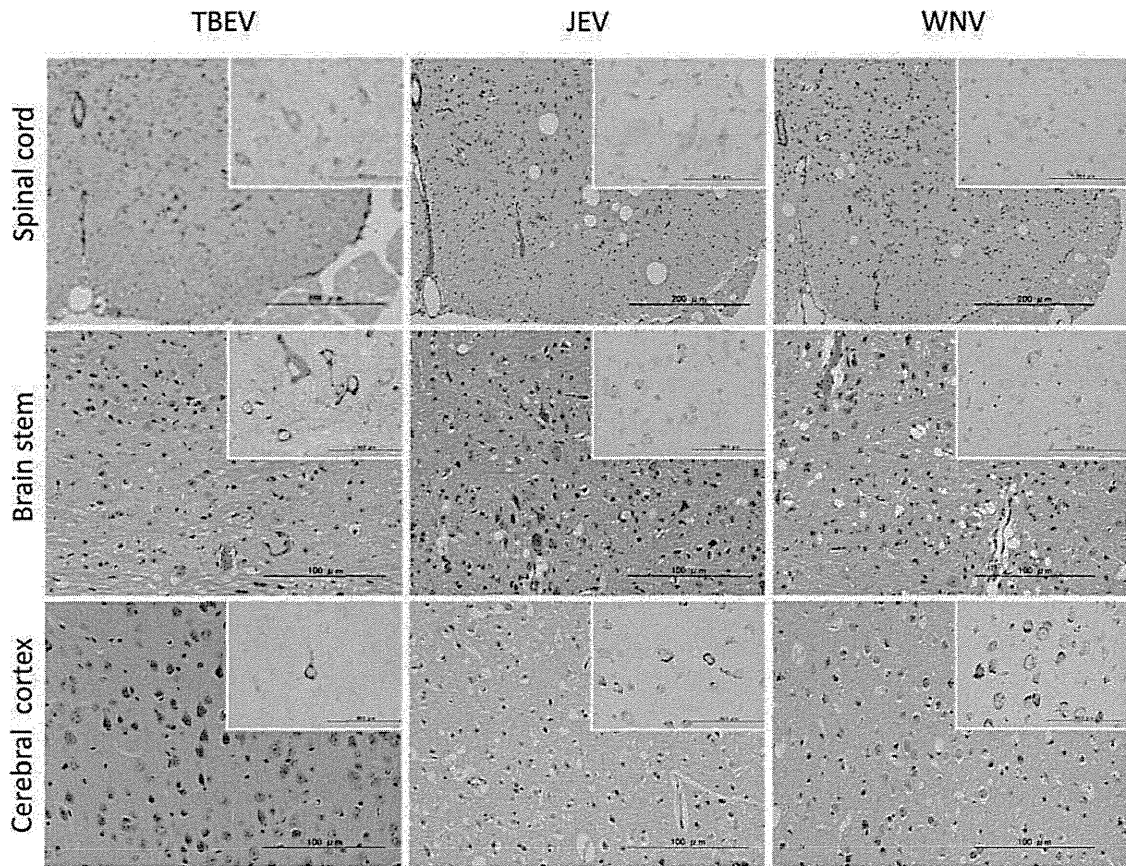


図 フラビウイルス静脈内接種後の BALB/c マウス中枢神経系における組織病変。

静脈内接種後に瀕死となったマウスの組織を比較した。左パネル、ダニ媒介性脳炎 (TBEV) 感染組織。感染 8 日目の脊髄、延髄および大脳皮質において変性した大型の錐体神経細胞にウイルス抗原が検出された(挿入図)。脊髄のみ炎症性細胞浸潤を認める。中央パネル、日本脳炎ウイルス (JEV) 感染組織。脊髄と脳幹の変性した錐体神経細胞にウイルス抗原が陽性である。大脳皮質の多くの細胞は急性壊死に陥り、ウイルス抗原は多くの大型神経細胞が強陽性であった。右パネル、ウエストナイルウイルス (WNV) 感染組織。脊髄と脳幹に神経食現象を認めるが、ウイルス抗原陽性細胞は少ない。大脳皮質の急性壊死あるいは変性した大型の神経細胞がウイルス抗原陽性であった。

表 フラビウイルス静脈内接種後の BALB/c マウスにおける組織病変とウイルス抗原陽性所見

解剖日	ダニ媒介性脳炎				日本脳炎ウイルス				ウエストナイルウイルス			
	3日	5日	7日	8日	3日	5日	7日	9-10日	3日	5日	7日	6-14日
腸管神経叢	0/0*	1/0	3/1	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1
脊髄	0/0	0/0	2/1	2/1	0/0	0/0	0/0	8/8	0/0	0/0	0/0	1/2
脳幹(視床)	0/0	0/0	1/0	2/1	0/0	0/0	0/0	9/9	0/0	0/0	0/0	6/7
大脳皮質	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	1/1	9/9	0/0	0/0	0/0	6/6

\*ウイルス抗原陽性動物数/組織病変陽性動物数

ダニ媒介性脳炎ウイルス感染 8 日目の動物数：3 匹、日本脳炎ウイルス感染 9-10 日目の動物数：9 匹、ウエストナイルウイルス感染 6-14 日目の動物数：10 匹。

及び予防接種政策推進研究事業)

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

クリミア・コンゴ出血熱の治療法に関する進展:文献的考察

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究要旨:クリミア・コンゴ出血熱に対しては、これまで治療薬としてリバビリンの投与が標準的であったが、その効果は科学的には証明されていない。一方、RNA ウイルスに対する広スペクトラムを有する抗ウイルス剤であるファビピラビルがクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに抗ウイルス活性を有し、しかもインターフェロン受容体ノックアウトマウスにおける感染動物モデルで、ファビピラビルがリバビリンよりもより高い治療効果が認められると報告された(PLoS NTD, 2014)。一方、クリミア・コンゴ出血熱の原因ウイルスであるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスと同じようにブニヤウイルス科に属する重症熱性血小板減少症候群ウイルスによる全身感染症(クリミア・コンゴ出血熱の病態に類似する)に対しても、ファビピラビルには高いリバビリンより遙かに高い治療効果の認められるとする研究成績が私たちのグループから発表された(mSphere, 2015)。ファビピラビルは日本で抗インフルエンザウイルス薬として開発された薬剤であり、インフルエンザウイルス感染症に対する治療薬としての治験が済んでいる。輸入感染症として日本でクリミア・コンゴ出血熱患者が発生した場合に備えて、ファビピラビルを使用できるように準備しておく必要があると考えられる。

#### A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱(Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF)は、日本では一類感染症に分類される感染症で、いわゆる狭義のウイルス性出血熱に分類される感染症の代表的な感染症である。ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類されるCCHFウイルス(CCHFV)によるマダニ媒介性ウイルス感染症である。アフリカ、東欧、中近東、中央アジア(インド、中国西部の新疆ウイグル自治区を含む)に広く分布している。ドイツや英国で輸入感染事例も発生しており、日本においても輸入感染事例発生時に備えておく必要がある。

2011年に中国の研究者らによりCCHFVと同様にブニヤウイルス科に分類される新規ウイルスによるマダニ媒介性ウイルス感染症、重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)が、中国の湖北省、河南省、山東省、黒竜江省等の山岳地域の農民の間で流行していることが報告された。SFTSウイルス(SFTSV)は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される。2013年には、SFTSが日本でも流行していることが明らかにされ、その対策が急務となっている。その対策研究の過程で、ファビピラビルがSFTSVに対して抗ウイルス活性を示し、さらにインターフェロンリセプターノックアウト(IFNRKO)マウスにおける感

染モデルにおいて、高い治療効果が示された。

ファビピラビルは日本の製薬メーカー富山化学の古田要介博士らにより開発された RNA ウイルスに対する広スペクトラム活性を示す抗ウイルス薬(RNA ポリメラーゼ阻害薬)である。

本研究の目的は CCHF に対する治療においてファビピラビルを用いることの可能性を文献的に評価することである。

## B. 研究方法

CCHF の抗ウイルス薬による治療に関する文献を精査し、CCHF に対する治療における最新の情報を確認した。また、SFTS に対する抗ウイルス薬による治療法に関する最新の文献を精査した。

これらの文献の内容を確認し、特に効果が期待されると考えられた favipiravir の CCHF に対する治療効果及び曝露後投与による感染(発症)予防効果について考察した。

## C. 研究結果

PubMed 上において「Crimean-Congo hemorrhagic fever」および「favipiravir」のキーワードで文献検索した結果、論文 1(Oestereich L, et al. Evaluation of antiviral efficacy of ribavirin, arbidol, and T-705 (favipiravir) in a mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever. PLoS Neglected Tropical Diseases, 8:e2804, 2014)のみがヒットした。また、「Severe fever with thrombocytopenia syndrome」および「favipiravir」のキーワードで文献検索した結果、論文 2(Tani H, et al. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with

lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. mSphere 1(1):e0061-15, 2015)がヒットした。

論文 1 では、リバビリンとファビピラビルの Vero E6 細胞における CCHFV に対する 50% inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>)はそれぞれ、2.8 µg/ml および 1.1 µg/ml とほぼ同等であった。しかし、IFNRKO マウスの感染モデルでは、リバビリンとファビピラビルの曝露後投与による発症予防効果は、大きく異なり、ファビピラビルの効果の方がリバビリンのそれよりも高かった。ファビピラビルとリバビリンの併用により、相乗効果が期待される成績が示されている。

SFTS に対する治療効果を、IFNRKO マウスを用いた研究(論文 2)においても同様の成績が得られた。リバビリンの曝露後投与により、致命率の改善は得られるものの、発症(体重減少)予防効果は限定的であった。一方、ファビピラビルを曝露(感染)直後に投与すると、致命率は 0%で、かつ、発症(体重減少)は認められなかった。SFTSV を感染させてから 3 日目までにファビピラビルを投与すると、致命率は 0%であり、かつ、発症の程度もコントロールに比較して軽症化していた。

## D. 考察

これまで CCHF に対しては、CCHF に対するリバビリンによる治療効果が確認されていない状況ではあるが、リバビリン投与が一般的であった。しかし、ファビピラビルによる治療効果を IFNRKO マウス用いた感染モデルで評価したところ、ファビピラビルによる治療効果および曝露後投与による発症予防効果はリバビリンのそれよりも遥

かに高かった。今後は CCHF に対してファビピラビルによる治療効果を評価することが求められる。

日本で CCHF の輸入感染事例が発生した場合には、可能であればファビピラビル投与を検討する必要がある。

#### E. 結論

ファビピラビルには CCHF 及び SFTS に対する治療効果および曝露後投与による発症抑制効果が期待される可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata Noriyo, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere* 1(1):e0061-15, 2015
- 2) Ejiri H, Lim CK, Isawa H, Kuwata R, Kobayashi D, Yamaguchi Y, Takayama-Ito M, Kinoshita H, Kakiuchi S, Horiya M, Kotaki A, Takasaki T, Maeda K, Hayashi T, Sasaki T, Kobayashi M, Saijo M, Sawabe K. Genetic and biological characterization of Muko virus, a new

distinct member of the species Great Island virus (genus Orbivirus, family Reoviridae), isolated from ixodid ticks in Japan. *Archives of Virology* 160(12):2965-2977, 2015

- 3) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Saijo M. Combination effects of ribavirin and interferons on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection. *Virology Journal* 12:181, 2015

##### 2. 学会発表

- 1) Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Uda A, Morikawa S, Komeno T, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Efficacy of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia virus infection. 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 2015
- 2) Lim CK, Ejiri H, Isawa H, Kuwata R, Kobayashi D, Yamaguchi Y, Takayama-Ito M, Kinoshita H, Kakiuchi S, Horiya M, Kotaki A, Takasaki T, Maeda K, Hayashi T, Sasaki T, Kobayashi M, Saijo M, Sawabe K. Characterization of Muko virus, a new distinct member of the species Great Island virus, isolated from ixodid ticks in Japan. 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 2015



H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の 発生予防に関する研究  
狂犬病等の疫学に関する研究

研究分担者 井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部
研究協力者 野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部
Bazartseren Boldbaatar	モンゴル・獣医学研究所

研究要旨:本研究では、海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病(リッサウイルス感染症を含む)について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計などを可能にすることを目的としている。今年度、モンゴル獣医学研究所の協力を得て、狂犬病と診断されたモンゴルの野生動物で流行している狂犬病ウイルスの分子疫学的な解析を行った。モンゴルではイヌ以外にキツネやオオカミでも狂犬病が維持されており、ウイルスの N 遺伝子を利用した分子系統樹からグループ A(モンゴル内陸:イヌ株・キツネ株・オオカミ株)とグループ B(ロシアとの国境沿い:イヌ株・キツネ株)に分類されることが明らかになった。グループ A は 5 つ以上のクレードに細分類できることが示され、オオカミ由来、キツネ由来、イヌ由来のウイルス株がそれぞれの宿主で維持されていることが示唆されたが、モンゴルでオオカミ、キツネ、イヌ間でどのように狂犬病ウイルスが流行・伝搬しているかを解明するためには、狂犬病を発症した時期や場所が近似しているウイルス株についてより詳細な系統解析を行う必要があると考えられた。今後、より詳細な解析を進めることで、異なる野生動物種間での狂犬病ウイルス伝搬と流行の機序解明が可能になると考えられた。

#### A. 研究目的

狂犬病はニュージーランド、オーストラリア、ハワイ、英国、日本などを除く世界のほぼ全域で流行している。毎年、アジアとアフリカを中心に 5 万～7 万人を超える死亡例があると推計されており、ヒトを含むほぼすべての哺乳類に致死的な脳炎を起こすウイルス性の動物由来感染症であ

る。

わが国では、1970 年と 2006 年に発生したヒトの輸入狂犬病 3 症例を除いて、半世紀以上にわたり狂犬病が国内で発生していない。しかしながら、アジア諸国ではイヌを中心に狂犬病が蔓延しており、ヒトの公衆衛生における大きな脅威となっている。

本研究の目的は、海外の研究協力者と共同してユーラシア大陸を中心とした野生獣の狂犬病（リッサウイルス感染症を含む）について流行状況に関する情報の収集、疫学調査、流行様式の解明、新規診断法開発等を行ってわが国への侵入可能性や発生予測・被害推計を可能にすることである。

今年度、モンゴル獣医学研究所の協力を得て、狂犬病と診断されたモンゴルの野生動物で流行している狂犬病ウイルスの分子疫学的な解析を行い、異なる野生動物種間での狂犬病ウイルス伝搬と流行の機序の解析を行った。

## B. 研究方法

モンゴルの獣医学研究所（Institute of Veterinary Medicine）の狂犬病サーベイランスで狂犬病陽性と診断された動物の脳組織からRNAを抽出して狂犬病ウイルスのN遺伝子について分子系統樹による疫学解析を行った。

### 本研究で使用した狂犬病の検体

モンゴル獣医学研究所の実験室で狂犬病と診断されたイヌ、キツネ、オオカミ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、動物種不明の24個体について脳組織中の狂犬病ウイルスの遺伝子増幅を行い、データベース上の遺伝子40配列と合わせて遺伝子解析を行った。本研究で新しく入手した狂犬病陽性と診断された動物の背景等について表1に示した。また、モンゴルの全国地図と狂犬病陽性となった動物の生息していた9省を図1に示した。

### Viral RNAの解析

モンゴルの獣医学研究所で狂犬病と診断された動物の脳材料から抽出したRNAはRNAstableチューブ（RNAstable Test Kit、Biomatrica, Inc.）を利用して室温で移送した。狂犬病ウイルスのN遺伝子をPCRで増幅させた後に、増幅cDNAの塩基配列をABI 3130 genetic analyzerで特定したものをGENETIX ver.12（株式会社ゼネティックス）で解析した（表2）。

### ■RT-PCRの反応条件

RT:

10 ul RNA

+

1 ul 50 ng/ul-Random primer  
(Promega, C1181)

↓

95 °C 1 min, on ice, room temp.

↓

+

4 ul 5 X Buffer

4 ul dNTP (2.5 mM each)

1 ul rRNasin (Promega, N2511)

1 ul AMV RTase (Promega, M9004)

↓

42 °C 45 min, 95 °C 5 min 4°C

PCR:

反応試薬

DW 33ul

10 X Buffer 5ul

2mM each-dNTP 5ul

50mM-MgSO<sub>4</sub> 2ul

JW12(mix) 2ul

JW6(mix)	2ul	+	
PI-Taq	0.2ul		BigDye Sequencing Buffer
Temp(x1)	1ul	(x5)	3.5ul
Total	50ul	+	

反応条件

94 °C 2 min

↓

94 °C 30 sec

50 °C 30 sec

68 °C 2 min

30 回

↓

4 °C

Template(606bp) (>10ng/ul)

5-20ug

+

シーケンスプライマー

(1pmol-each/ul) 3.2ul

+

DW

up to 20ul

= Total 20ul

使用酵素

Polymerase: Platinum Taq High Fidelity

(Invitrogen 11304)

dNTP(2mM each)

(Toyobo NTP-301)

使用プライマー

JW12(mix) 10pmol-each

JW6(mix) 10pmol-each

使用プライマー

JW12(mix) (1pmol-each)

JW6(mix) (1pmol-each)

サイクルシーケンス

96°C 3min

↓

96°C 10sec

50°C 5sec

60°C 4min

25 回

↓

4°C

■増幅cDNAのシーケンス

精製: QIAquick PCR Purification kit

(Qiagen 28104)

反応試薬

BigDye Terminator Ready Reacting Mix

(x 2.5) 1ul

サイクルシーケンス後、Ethanol/EDTA 抽出を行い ABI 3130 genetic analyzer で配列を決定した。

参考論文: Back EM, Lowings JP, Smith J, Heaton PR, McElhinney LM. J.Virol.Method 105:25-35, 2002.

### C. 研究結果

モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断されたイヌ、キツネ、オオカミ等について、狂犬病ウイルスの遺伝子配列特定後にデータベース上から選択した狂犬病ウイルス40株の遺伝子配列と合わせて系統樹を作成したところ、ロシアや韓国で分離されたウイルスの遺伝子配列に近似するグループBと、モンゴル国内で流行しているウイルスで構成されるグループAの二種類の遺伝子型に大きく分かれた(図2)。

グループAの狂犬病ウイルスは、オオカミ、キツネ、イヌ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ラクダが宿主であり、このうち、オオカミ、キツネ、イヌが狂犬病の流行を媒介すると考えられた。

グループAに分類された狂犬病ウイルスをCladogram / Circularで系統樹表記することで、オオカミ、キツネ、イヌ由来の狂犬病ウイルスは5つのサブグループに分類されることが明らかとなった(図3)。

サブグループA1はキツネ由来5株とオオカミ由来1株、サブグループA2はオオカミ由来3株、サブグループA3とA4はキツネ由来1株とイヌ由来1株、サブグループA5はイヌ由来2株を含むクレードを構成した。

サブグループA3とA4に含まれるイヌ由来株はいずれもキツネ由来株から派生した位置に分類され、グループA1に含まれるキツネ由来5株はオオカミ由来の1株から派生した位置に系統分類さ

れた。

モンゴル獣医学研究所で脳材料から抽出したRNAをRNAstableチューブ(RNAstable Test Kit、Biomatrix, Inc.)によって移送した24株のRNA中、15株は塩基配列を特定することができたが、残り9株は十分なRNA量が回収できなかった。実験記録から、RNAstableチューブによるRNA乾燥が不十分であったため室温移送中にRNAが失活したものと考えられた。今後の検討課題である。

### D. 考察

新たに遺伝子解析を行った15株(Gobi-Altai省6株、Dundgovi省2株、Govi-Sumber省1株、Dornogovi省1株、Bulgan省2株、Tuv省2株、Bayankhongor省1株)は、いずれもモンゴル国内で流行しているグループAに分類され、ロシアとの国境を越えて移動したと考えられるグループB(Kuzmin, I.V., et al. J. Wildlife Dis. 40:617-631, 2004 and Bazartseren B., et al. Jpn. J.Infect. Dis. 63:358-363, 2010)に分類されるウイルス株はなかった。

本研究で、モンゴル国内で流行している狂犬病は、イヌとキツネ以外にオオカミでもウイルスが維持されていることが示唆された。

グループAは5つ以上のクレードに細分類できることが示され、オオカミ由来、キツネ由来、イヌ由来のウイルス株がそれぞれの宿主で維持されていることが示唆されたが、モンゴルでオオカミ、キツネ、イヌ間でどのように狂犬病ウイルスが流行・伝搬しているかを解明するためには、狂犬病を発症した時期や場所が近似しているウイルス株についてより詳細な系統解析を行う必要がある。

ると考えられた。

## E. 結論

今年度、モンゴル獣医学研究所の協力を得て、狂犬病と診断されたモンゴルの野生動物で流行している狂犬病ウイルスの分子疫学的な解析を行った。モンゴルではイヌ以外にキツネやオオカミでも狂犬病が維持されていることが示唆され、ウイルスの N 遺伝子を利用した分子系統樹からグループ A(モンゴル内陸:イヌ株・キツネ株・オオカミ株)とグループ B(ロシアとの国境沿い:イヌ株・キツネ株)に分類された。グループ A は 5 つ以上のクレードに細分類できることが示され、オオカミ由来、キツネ由来、イヌ由来のウイルス株がそれぞれの宿主で維持されていることが示唆されたが、モンゴルでオオカミ、キツネ、イヌ間でどのように狂犬病ウイルスが流行・伝搬しているかを解明するためには、狂犬病を発症した時期や場所が近似しているウイルス株についてより詳細な系統解析を行う必要があると考えられた。今後、野生動物における異なる宿主間での狂犬病ウイルス伝搬と流行の機序解明につながるものと期待された。

## J. 健康危険情報

なし

## K. 研究発表

### 1.論文等発表

1) 井上 智. 狂犬病. 特集:感染症の新たな脅威.

The Journal of Public Health Practice. 医学書院. 2015. 79:467-472.

2) 濱本紀子、井上 智. 狂犬病とその対策. 山口獣医学雑誌. 41:1-12、2015 (Hamamoto N. and Inoue S. Rabies and rabies prevention in Japan. Yamaguchi J. Vet. Med. 41:1-12)

3) 井上 智、畠山 薫、水越文徳、野口 章. 特集:国境を越える感染症。狂犬病。獨協医学会 (Dokkyo Journal of Medical Sciences)。42:215-223、2015

4) 井上 智. 第 8 弾 狂犬病。2015 年度 年間連載「感染症」。中学保健ニュース。少年写真新聞社 2016 年。少年写真新聞 (Junior's Visual Journal) 第 1646 号付録、1 月 28 日発行、2016

### 1.学会発表等

1) Yamamoto1, K., Ujiie1, M., Noguchi A., Kato, Y., Takeuchi, S., Shinohara, K., Matono, T., Uemura, H., Fujiya1, Y., Mawatari, M., Kutsuna1, S., Takeshita1, N., Hayakawa, K., Kanagawa S., Inoue S., Morikawa S., Ohmagari, N. Rabies Post-exposure Prophylactic Vaccination for Japanese Travelers. Conference of the International Society of Travel Medicine. 24-28 May, 2015. Centre des Congrès de Québec, Canada.

2) Kimitsuki, K., Boonsriroj, H., Manalo, L.D., Shimatsu, T., Shiwa, N., Takahashi, Y., Tanaka,

- N., Inoue, S. and Park, C.-H. A pathological study of the salivary glands of rabid dogs in the Philippines. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP) meeting and symposium 2015. 8-11 November, 2015. Institute of Biology Auditorium University of the Philippines Diliman, Quezon city, Philippines.
- 3) Shimatsu, T., Kawamoto, N., Shiwa, N., Kimitsuki, K., Boonsriroj, H., Manalo, L.D., Shinozaki, H., Takahashi, Y., Tanaka, N., Inoue, S. and Park, C.-H. The utility of muzzle skin of rabid dogs as antemortem and postmortem diagnosis. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP) meeting and symposium 2015. 8-11 November, 2015. Institute of Biology Auditorium University of the Philippines Diliman, Quezon city, Philippines.
- 4) Shiwa, N., Sumi, Y., Shimatsu, T., Kawamoto, N., Kimitsuki, K., Boonsriroj, H., Manalo, L.D., Inoue, S. and Park, C.-H. The utility of muzzle skin of rabid dogs as antemortem and postmortem diagnosis. 7th Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP) meeting and symposium 2015. 8-11 November, 2015. Institute of Biology Auditorium University of the Philippines Diliman, Quezon city, Philippines.
- 5) Daria Manalo, Boldbaatar Bazartseren, 朴 天鎬、井上 智。直接迅速免疫組織化学(DRIT)法を利用したフィリピンにおける狂犬病検査法の検討。第 158 回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 6) 野口 章、町田一哉、徳本誠治、寺原孝明、加来義浩、奥谷晶子、内藤誠之助、森川 茂、井上 智。マイクロニードル皮内免疫法による簡便で効果的な狂犬病ワクチンの接種法に関する研究。第 158 回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 7) 志和 希、島津太一、君付和範、Hassadin Boonsriroj, Daria L. Manalo、井上 智、朴 天鎬。狂犬病発病犬の味蕾乳頭(有郭乳頭)と舌小唾液腺(エブネル腺)に関する病理学的研究。第 158 回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 8) 島津太一、志和 希、君付和範、Hassadin Boonsriroj, Daria L. Manalo、井上 智、朴 天鎬。狂犬病発病犬の鼻口部洞毛は死後組織診断材料として極めて有用である。第 158 回日本獣医学会学術集会、公衆衛生分科会。2015 年 9 月 7 日-9 日、北里大学獣医学部、十和田市、青森県
- 9) Minoru Tobiume, Yuko Sato, Satoshi Inoue, Yoshio Suzuki, Kazumi Shimada, Tetsuya Uno, Michiyo Kataoka。街上毒狂犬病ウイルスの細胞内抗原局在と粒子形成部位の検討。第 63 回日本ウイルス学会学術集会。2015 年 11 月 22 日-24 日、福岡国際会議場、福岡市、

福岡県

- 10) Inoue S. Laboratory network for diagnosis of animal rabies. The 12th Japan-Taiwan symposium on vector-borne diseases, vaccine preventable diseases. 10-11 Sep, 2015. National Institute of Infectious Diseases. Tokyo, Japan.
- 11) 井上 智。特別講義:最近話題となっている感染症。2015年4月27日、日本獣医生命科学大学、東京都。
- 12) 井上 智。狂犬病、公衆衛生における課題。2015年6月11日、平成27年度学際領域特別講義、岐阜大学連合獣医学研究科。帯広畜産大学、北海道。
- 13) 井上 智。狂犬病:ガイドライン等に基づいた注意点等。2015年6月23日、平成27年度狂犬病予防業務地方ブロック技術研修会、厚生労働省健康局結核感染症課。岩手県環境保健研究センター、岩手県。
- 14) 井上 智。狂犬病:ガイドライン等に基づいた注意点等。2015年8月24日、平成27年度狂犬病診断研修会、山口県環境生活部。国立大学法人山口大学共同獣医学部 Icover 棟・病理解剖棟、山口県。
- 15) 井上 智。研修・特別講演:世界における狂犬病の発生状況と国内対策について。2015年9月4日、平成27年度全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会、全国公衆衛生獣医師協議会。明治記念館、東京都。
- 16) 井上 智。公開講座:狂犬病対策における獣医師の役割。2015年10月16日、第64回九州地区獣医師大会:平成27年度日本獣医公衆衛生学会(九州地区)。メルパルク熊本、熊本市、熊本県。
- 17) 井上 智。日本に必要な狂犬病の予防対策について(Rabies: Crisis preparedness for rabies in Japan)、第1部 国境なき人獣共通感染症-拡大阻止へ-。迫り来る感染症への備え-人獣共通感染症に焦点を当てて-国境なき家畜伝染病防疫対策の取り組み(Part 1. Preparation for Zoonotic Diseases in a Borderless World - To stop spreading. Preparing for Looming Disease Threats - Special Emphasis on Zoonosis Control - The Global Countermeasures against Trans-boundary Animal Diseases)。2015年11月13日、宮崎大学 第5回第国際シンポジウム(The 5th International Symposium)。宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター(Center for Animal Disease Control University of Miyazaki)。宮崎観光ホテル、宮崎市、宮崎県。
- 18) 井上 智。狂犬病の発生状況について。第3回九州地区狂犬病診断研修会。宮崎大学人獣共通感染症教育・研究プロジェクト、宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター、宮崎県福祉部保健部衛生管理課。2015年12月16日、宮崎大学、宮崎県。



- 19) 井上 智。地域における危機管理対応について。第3回九州地区狂犬病診断研修会。宮崎大学人獣共通感染症教育・研究プロジェクト、宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター、宮崎県福祉部保健部衛生管理課。2015年12月16日、宮崎大学、宮崎県。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1. モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断された動物24頭の背景等

Province	Species				
	Wolf	Fox	Dog	Domestic animals	Unknown
Govi-Altai	4 (3)		2 (2)	1 (1)	
Dundgovi				3 (2)	
Uvurkhangai					2
Govi-Sumber			1 (1)		
Dornogovi				3 (1)	
Dornod					1
Bulgan		1 (1)		3 (1)	
Tuv		1 (1)		1 (1)	
Bayankhongor					1 (1)

※ ( )内の数: ウイルスRNA増幅後にN遺伝子の部分配列

図1. モンゴルの全国地図と狂犬病が陽性であった動物のいた省



図2. モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断されたオオカミ由来株、キツネ由来株、イヌ由来株の系統樹(UPGMA)

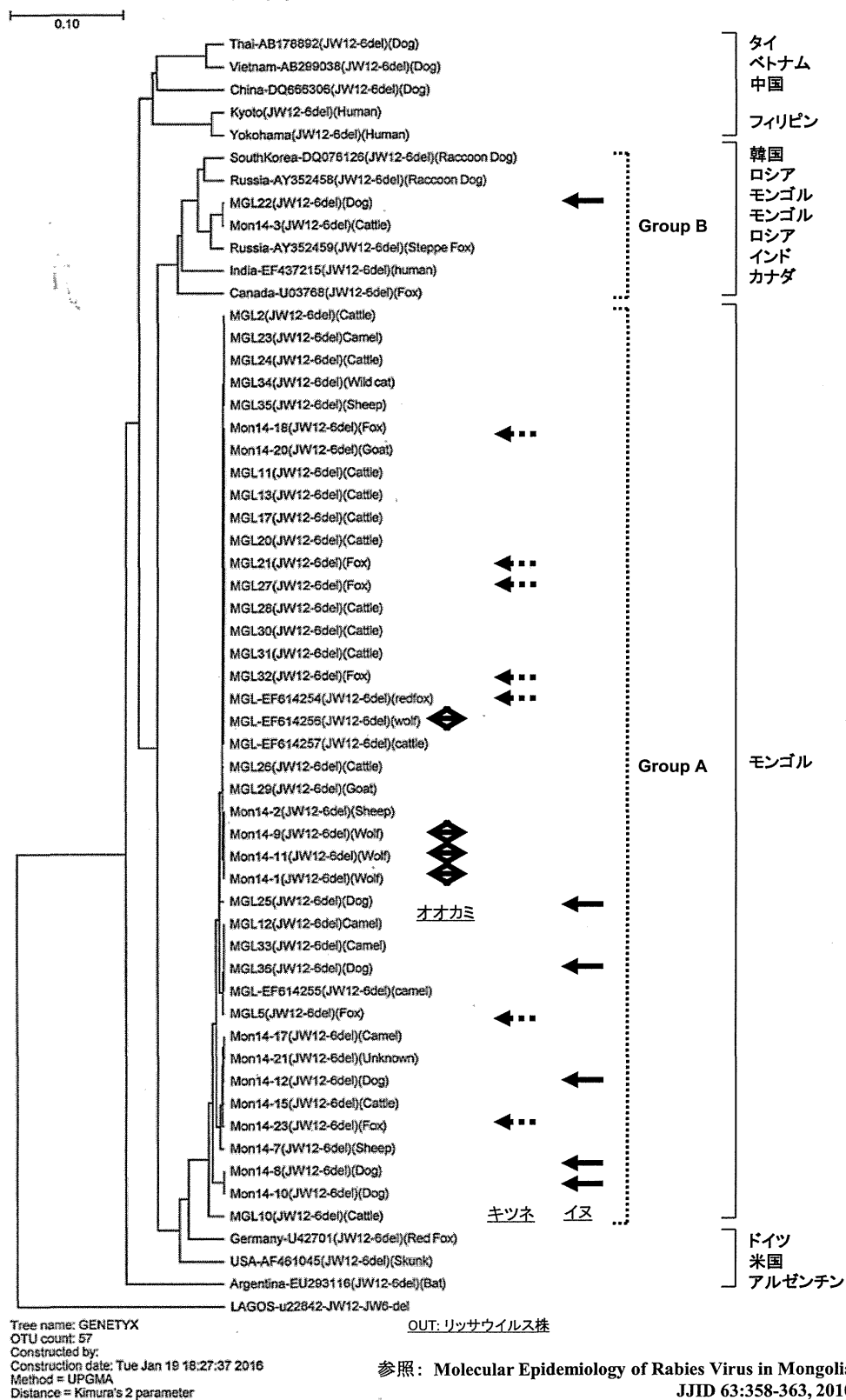
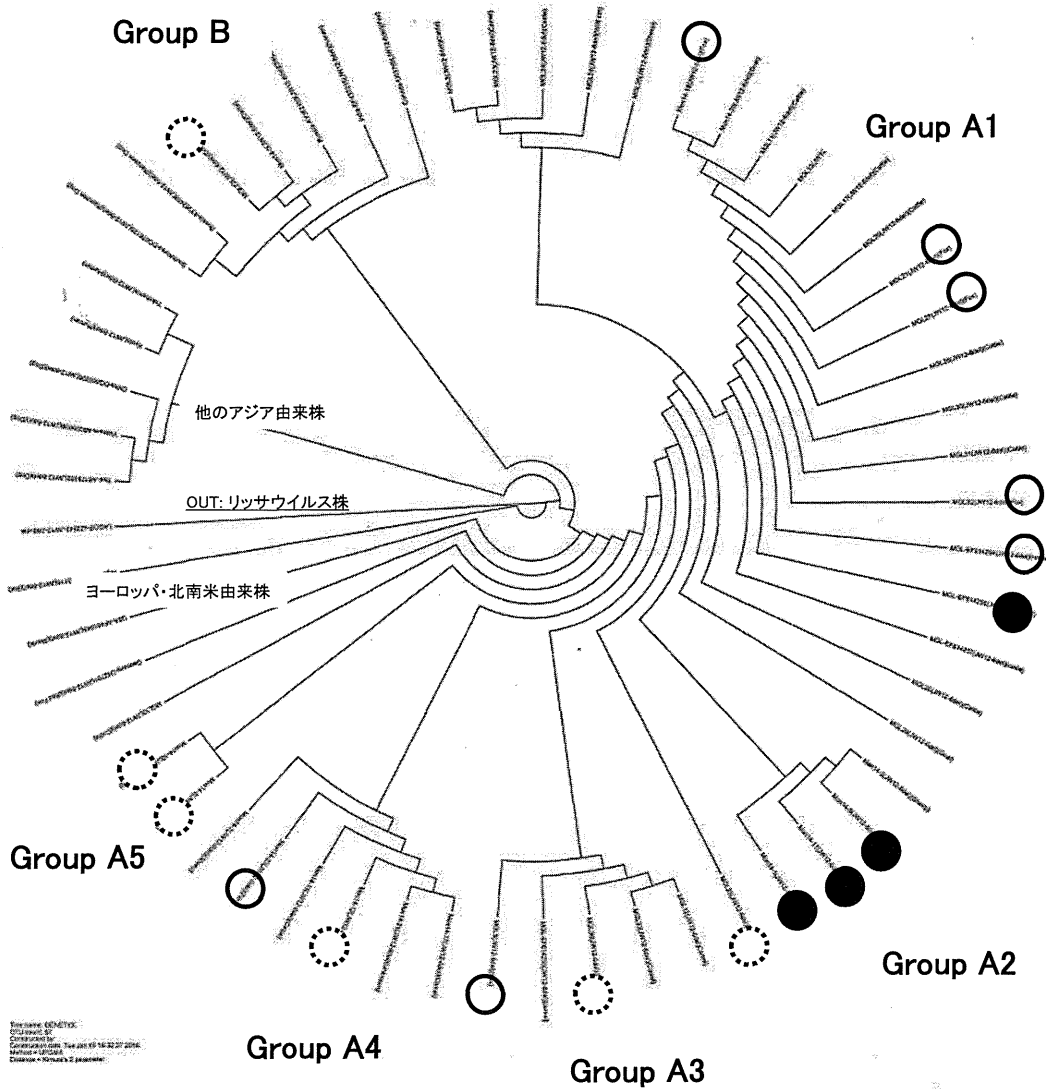


図3. モンゴル獣医学研究所で狂犬病と診断されたオオカミ由来株、キツネ由来株、イヌ由来株の系統樹 (Cladogram / Circular)



Tree name: GENETICS  
 2022/06/06 09:52  
 Characters: 57  
 Characters used: 57 (100%)  
 Method: UPGMA  
 Distance: Jaccard's 2 parameter

- オオカミ由来株
- キツネ由来株
- (点線) イヌ由来株

Cladogram / Circular  
 Strains = 57